

令和元年7月4日現在

機関番号：83712

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10008

研究課題名(和文) 遺伝的背景の異なる多数の患者iPS細胞を用いた脊髄性筋萎縮症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for SMA using SMA-iPSCs disease models with different genetic background

研究代表者

船戸 道德 (FUNATO, Michinori)

独立行政法人国立病院機構長良医療センター(臨床研究部)・長良医療センター臨床研究部・第二小児科医長

研究者番号：30420350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄性筋萎縮症(SMA)は、現在までのところ有効な治療法の開発までには至っていない。本研究では、遺伝的背景の異なる多数のSMA患者の疾患特異的人工多能性幹細胞(iPS細胞)由来の神経細胞を用いて複数の試験管内疾患モデルを構築し、SMAの標準的な治療法を開発することを目的とする。現在までに、遺伝的背景の異なる計19名のSMA患者から線維芽細胞を作製し、さらには患者iPS細胞の樹立を行った。また、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン類似薬、フリーラジカルスカベンジャー(エダラボン)、ドコサヘキサエン酸、 α -セクレターゼ阻害剤、ルフィナミドの薬効評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SMAは難治性の希少疾患ではあるが、背景にひそむ病態は多種多様である。本研究によって、薬剤の応答性の個人差が解明されれば、希少疾患におけるテーラーメイド医療へのさらなる道筋を提示することになる。

研究成果の概要(英文)：Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive neuromuscular disorder characterized by the degeneration of spinal motor neurons. This disease is caused by the deletion of the survival motor neuron protein. Currently, there are no curative agents for SMA, although some research groups have developed treatments based on the molecular pathophysiology of this disease. Our purpose in this study is to establish a number of human SMA with different genetic background-derived induced pluripotent stem cells (SMA-iPSCs) disease model and develop a standard treatment for SMA.

Before now, we established SMA-iPSCs disease models derived from 19 SMA patients with different genetic background. In addition, we assayed a therapeutic drug of thyrotropin-releasing hormone (TRH) analog, a free radical scavenger (edaravone), a docosahexaenoic acid, α -secretase inhibitor, and rufinamide.

研究分野：小児科学、再生医学

キーワード：疾患モデル iPS細胞 薬剤応答性 治療薬開発

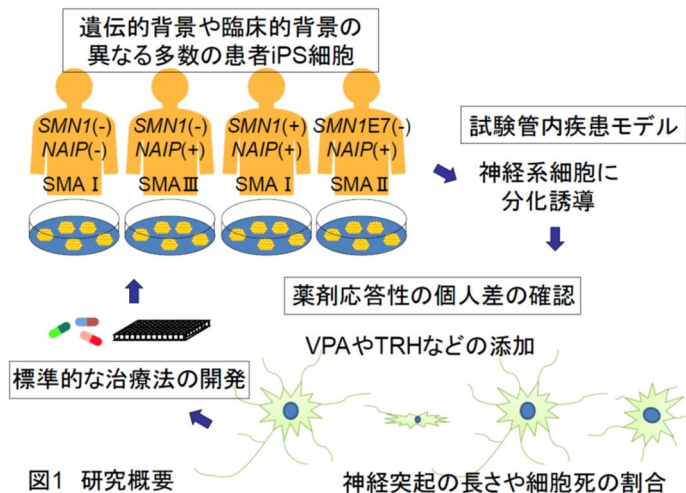
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄性筋萎縮症 (Spinal Muscular Atrophy, SMA) は、脊髄の運動神経細胞 (脊髄前角細胞) の変性による筋萎縮と進行性の筋力低下を主徴とする常染色体劣性遺伝病であり、難病の患者に対する医療等に関する法律に規定される指定難病の一つである [1]。主たる原因は *SMN1* (survival motor neuron 1) 遺伝子と *SMN2* 遺伝子によってコードされる SMN 蛋白の減少にある。*SMN1* と *SMN2* はともに第 5 染色体長腕に位置し、*SMN1* は完全長 SMN 蛋白を、*SMN2* はエクソン 7 と 8 の 5 塩基の違いによって大部分がエクソン 7 を欠く不安定な短縮型 SMN 蛋白を合成する。約 95% の患者ではこの *SMN1* が欠失し、*SMN2* による不安定な短縮型 SMN 蛋白と少量の完全長 SMN 蛋白しか合成出来ないことで発症する [2, 3]。

SMA の治療手段として、これまでに多くの研究グループが、*SMN2* の転写活性やスプライシングの調節、SMN 蛋白の安定化、欠失する *SMN1* 遺伝子の導入、神経保護などの方法を開発してきたが、現在までのところ確実に有効な治療法の開発までには至っていない [4]。その原因の一つとして、これまでの患者の線維芽細胞や動物モデルを用いた治療薬開発では、種差や個体差、細胞株の違い等の問題による薬物代謝・動態関連分子や薬物標的分子並びにそれらの発現に影響する環境要因などが複雑に解析出来なかったことが挙げられる。その解決方法として、最近では疾患特異的人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell, iPS 細胞) を用いた研究が積極的に行われるようになり、これまでにバルプロ酸ナトリウム (Sodium Valproate, VPA) や N-acetylcysteine などの治療薬が実際に解析可能であることが報告され [5, 6]、一部に細胞株間での薬剤の応答性の違いが報告されている [7]。

このように iPS 細胞を含めた幹細胞研究では再生医療はもちろん医薬品の薬物動態の解明にも期待が寄せられている。しかし、現在までのところ、多数の患者から iPS 細胞を樹立し、その iPS 細胞由来の罹患細胞に対する薬剤応答性を調べ、その応答能と実際の臨床試験での効果を統計学的に解析した報告はない。本研究は、iPS 細胞技術を用いた疾患の治療制御事例に繋がる可能性がある。



2. 研究の目的

本研究では、遺伝的背景の異なる多数の SMA 患者の iPS 細胞由来の神経細胞を用いて複数の試験管内疾患モデルを構築し、薬剤応答性の個人差の要因を解明することなどによって、SMA の標準的な治療法を開発することが目的である。最終的には SMA モデルマウスを用いて非臨床試験を行い、医師主導試験に繋げることを目指す。

3. 研究の方法

本研究計画では、SMA に対して確実に効果のある治療法を開発を目指して、まずは遺伝的背景の異なる多数の患者 iPS 細胞を用いた SMA の試験管内疾患モデルを構築する。次に、既報の開発候補薬剤や独自に開発中の薬剤等を添加することによって薬剤応答性の個人差を確認する。その後、その薬剤応答性の個人差の要因の解明や各種薬剤の添加条件を検討することなどによって、SMA に対する汎用性の高い治療法を確立する。研究計画を図 1 に示す。

4. 研究成果

-) SMA の患者 1 名からエピゾーマルベクターによる初期化誘導 6 因子 (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *LIN28*, *p53shRNA*) の遺伝子導入にて患者 iPS 細胞を樹立した (図 2)
-) 既報の無血清凝集浮遊培養法による分化誘導法を改良し、患者 iPS 細胞由来の脊髄運動神経細胞及び神経膠細胞を作製した。

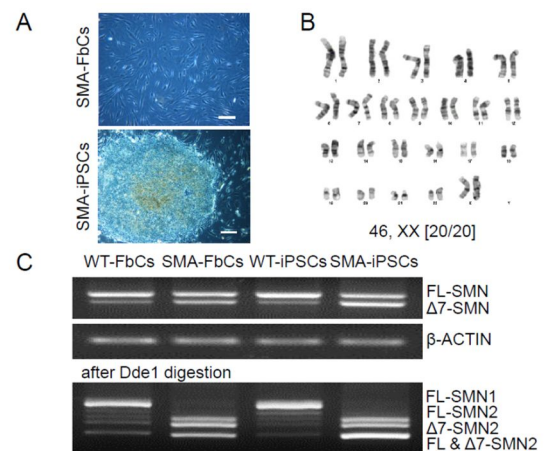
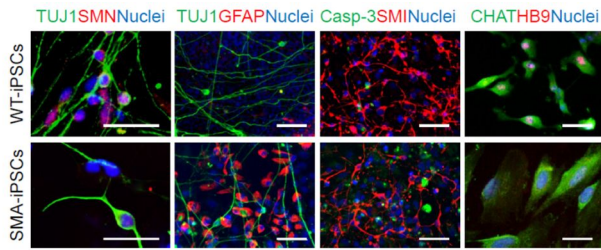


図2 SMAII型の患者からiPS細胞を樹立



- SMA患者では
- 1) SMN蛋白質が減少
 - 2) TUJ1陽性神経突起が短い
 - 3) GFAP陽性の神経膠細胞が増加
 - 4) Casp-3(カスパーゼ3)陽性SMI陽性の神経細胞のアポトーシスが増加
 - 5) CHAT(コリンエステラーゼ)陽性HB9陽性の脊髄神経細胞が減少

図3 試験管内で神経細胞を作製しSMAの病態を再現した

ルモン放出ホルモン類似薬 (Tyrotropin-releasing hormone analog, TRH) の薬効評価を行ったところ、TRH が患者 iPSC 細胞由来の運動神経細胞の完全長の SMN 蛋白を増加するだけでなく、神経突起の伸長にも寄与することを見出した (図4)

)TRH の完全長 SMN 蛋白の上昇メカニズムを多方面から解析し、*SMN2* 遺伝子の転写活性の上昇と GSK-3 のリン酸化による SMN 蛋白の安定化が寄与していることを見出した。

)TRH で効果を示さなかった脊髄運動神経細胞の細胞死の抑制について、さらに研究を進めるため、フリーラジカルスカベンジャー (エダラボン) の薬効評価を行ったところ、回薬剤に脊髄運動神経細胞の細胞死の抑制効果があることを見出した (図5)

)エダラボンの脊髄運動神経細胞の細胞死の抑制効果について、多方面から解析し、エダラボンがミトコンドリア内の酸化ストレスの減少に寄与することを見出した。

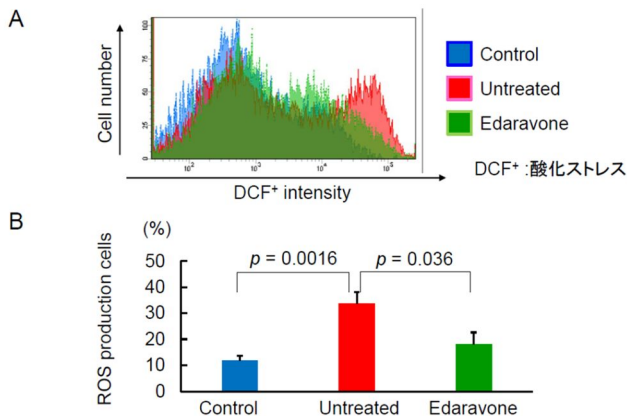


図5 SMA患者の神経細胞は酸化ストレスが上昇している

囲に増加していることを見出した。また、この神経膠細胞の増加は γ -セクレターゼ阻害剤が抑制し、SMAモデルマウスの運動機能の改善に繋がることを世界で初めて見出した (図6)

- xi) 遺伝的背景や臨床的背景の異なる計19名のSMA患者 (病期分類0型0名、型5名、型9名、型5名、型0名) から線維芽細胞及びiPS細胞の樹立を行った。

) 正常コントロールの iPSC 細胞として 201B7 株を用いて比較検討したところ、患者 iPSC 細胞由来の神経系細胞において、1)SMN 蛋白の減少、2)運動神経突起の伸長の低下、3)神経膠細胞数の増加、4)脊髄運動神経細胞の細胞死の増加、5)脊髄運動神経細胞数の減少が認められ、試験管内で SMA の病態を模倣することに成功した (図3)

) 構築した SMA の試験管内疾患モデルの有用性を確認する目的で、申請者らが臨床試験等で開発を進めてきた甲状腺刺激ホ

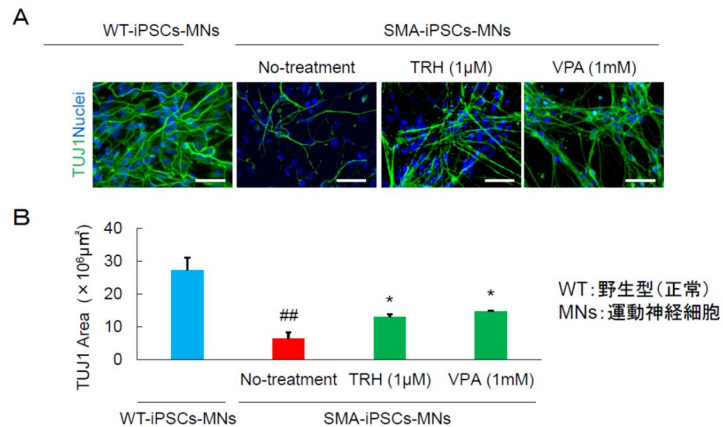


図4 TRHのSMN蛋白発現上昇効果はSMA患者の神経突起を再生する

)さらにエダラボンは、酸化ストレスの抑制を介して核内の SMN 蛋白を増加させ、神経保護作用や神経突起の伸長作用を有することを見出した。

)酸化ストレスの抑制作用により強い神経保護作用を有するドコサヘキサエン酸をSMAモデルマウス (*mSnn*^{+/-}, *SMN2*^{+/+}, *SMN*⁷^{+/+})に投与したところ、運動機能の改善を認め、治療薬の候補と成り得る事を提示した。

)神経膠細胞の増加についての検討では、SMAの患者iPS細胞を用いた試験管内疾患モデルやSMAのモデルマウスを用いて、神経膠細胞が脊髄中心管周

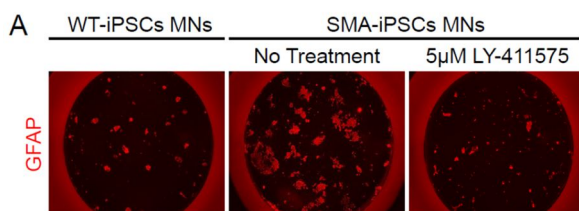


図6 γ -セクレターゼは神経膠細胞の増加を抑制する

- 1) SMNのエクソン7,8の欠失及びNAIPのエクソン5,6の欠失・・・3名
 - 2) SMNのエクソン7,8のみの欠失・・・12名
 - 3) SMNのエクソン7のみの欠失・・・2名
 - 4) SMNのエクソン7,8及びNAIPのエクソン5,6ともに欠失なし・・・2名
- また、すべての患者 iPS 細胞の未分化能及び多分化能の確認が終了した。

xii) 遺伝的背景や臨床的背景の異なる計19名の SMA 患者の線維芽細胞を用いて、各種抗てんかん薬の完全長 SMN 遺伝子の転写活性を調べたところ、ルフィナミドが Ⅰ型や Ⅱ型の患者の SMN 遺伝子を上昇させることを見出した。さらにルフィナミドは、Ⅰ型や Ⅱ型の患者 iPS 細胞由来の運動神経細胞の神経突起を伸長させることも世界で初めて確認した(図7)。

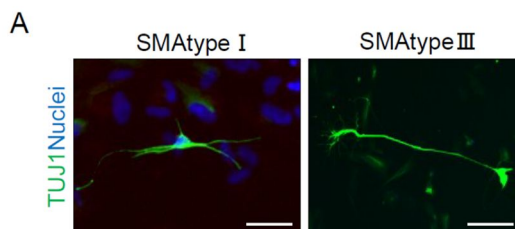


図7 SMAⅢ型ではルフィナミドにより運動神経突起が伸長する

<引用文献>

1. Crawford TO, Pardo CA. The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* 1996;3:97-110.
2. Hahnen E, Forkert R, Marke C et al. Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Hum Mol Genet* 1995;4:1927-1933.
3. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ et al. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:6307-6311.
4. Nurputra DK, Lai PS, Harahap NI et al. Spinal muscular atrophy: from gene discovery to clinical trials. *Ann Hum Genet* 2013;77:435-463.
5. Ebert AD, Yu J, Rose FF, Jr. et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009;457:277-280.
6. Wang ZB, Zhang X, Li XJ. Recapitulation of spinal motor neuron-specific disease phenotypes in a human cell model of spinal muscular atrophy. *Cell Res* 2013;23:378-393.
7. Sareen D, Ebert AD, Heins BM et al. Inhibition of apoptosis blocks human motor neuron cell death in a stem cell model of spinal muscular atrophy. *PLoS One* 2012;7:e39113.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1. Ando S, Funato M, Ohuchi K, Inagaki S, Sato A, Seki J, Kawase C, Saito T, Nishio H, Nakamura S, Shimazawa M, Kaneko H, Hara H. The Protective Effects of Levetiracetam on a Human iPSCs-Derived Spinal Muscular Atrophy Model. *Neurochem Res.* 2019 Jul;44(7):1773-1779. doi: 10.1007/s11064-019-02814-4.
2. Ohuchi K, Funato M, Ando S, Inagaki S, Sato A, Kawase C, Seki J, Nakamura S, Shimazawa M, Kaneko H, Hara H. Impairment of oligodendrocyte lineages in spinal muscular atrophy model systems. *Neuroreport.* 2019 Mar 20;30(5):350-357. doi: 10.1097/WNR.0000000000001206.
3. Ohuchi K, Funato M, Yoshino Y, Ando S, Inagaki S, Sato A, Kawase C, Seki J, Saito T, Nishio H, Nakamura S, Shimazawa M, Kaneko H, Hara H. Notch Signaling Mediates Astrocyte Abnormality in Spinal Muscular Atrophy Model Systems. *Sci Rep.* 2019 Mar 6;9(1):3701. doi: 10.1038/s41598-019-39788-w.
4. Ohuchi K, Ono Y, Joho M, Tsuruma K, Ogami S, Yamane S, Funato M, Kaneko H, Nakamura S, Hara H, Shimazawa M. A Docosahexaenoic Acid-Derived Pro-resolving Agent, Maresin 1, Protects Motor Neuron Cells Death. *Neurochem Res.* 2018 Jul;43(7):1413-1423. doi: 10.1007/s11064-018-2556-1.
5. Ando S, Funato M, Ohuchi K, Kameyama T, Inagaki S, Seki J, Kawase C, Tsuruma K, Shimazawa M, Kaneko H, Hara H. Edaravone is a candidate agent for spinal muscular

atrophy: In vitro analysis using a human induced pluripotent stem cells-derived disease model. Eur J Pharmacol. 2017 Nov 5;814:161-168. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.08.005.

6. Ohuchi K, Funato M, Kato Z, Seki J, Kawase C, Tamai Y, Ono Y, Nagahara Y, Noda Y, Kameyama T, Ando S, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H, Kaneko H. Established Stem Cell Model of Spinal Muscular Atrophy Is Applicable in the Evaluation of the Efficacy of Thyrotropin-Releasing Hormone Analog. Stem Cells Transl Med. 2016 Feb;5(2):152-63. doi: 10.5966/sctm.2015-0059.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. Ando S, Ohuchi K, Funato M, Nakamura S, Shimazawa M, Kaneko H, Hara H. Skeletal muscle atrophy and impaired myogenesis in spinal muscular atrophy. 1st Global Congress of Pharmacy Faculties (Salamanca, Spain, 2018, 9/24-28)
2. Ohuchi K, Ono Y, Joho M, Ogami S, Yamane S, Funato M, Kaneko H, Nakamura S, Shimazawa M, Hara H. A docosahexaenoic acid-derived pro-resolving agent, maresin 1, protects neurodegeneration in vitro and in vivo. 2nd International Conference & Expo on Pharmacology & Regulatory Affairs (Berlin, Germany, 2018, 8/6-8)
3. Ohuchi K, Funato M, Yoshino Y, Ando S, Inagaki S, Kawase C, Seki J, Nakamura S, Shimazawa M, Kaneko H, Hara H. The inhibition of Notch signaling ameliorates the motor functional deficits and astrocytic abnormality of in vitro and in vivo spinal muscular atrophy models. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (京都, 2018, 7/1-6)
4. Ando S, Ohuchi K, Funato M, Nakamura S, Shimazawa M, Kaneko H, Hara H. The protective effects of levetiracetam on spinal muscular atrophy models. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (京都, 2018, 7/1-6)
5. Ando S, Funato M, Ohuchi K, Tsuruma K, Shimazawa M, Kaneko H, Hara H. The Protective Effects of Edaravone in Generated Spinal Motor Neuron Using iPSCs Derived from a Spinal Muscular Atrophy Patient. 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology (福岡, 2017, 5/11-14)
6. 大内一輝、舩戸道徳、川瀬千鶴、関順子、安藤菜、稲垣賢、鶴間一寛、嶋澤雅光、金子英雄、原英彰. 脊髄性筋萎縮症病態におけるグリア系譜細胞の分化異常の関与 第130回日本薬理学会近畿部会(京都、2016、11/19)
7. 安藤菜、舩戸道徳、大内一輝、鶴間一寛、嶋澤雅光、金子英雄、原英彰 脊髄性筋萎縮症 iPSC 細胞由来運動ニューロンを用いたエダラボンの薬効解析 第15回日本再生医療学会総会(大阪、2016、3/17-19)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：脊髄性筋萎縮症治療薬

発明者：原英彰/大内一輝/舩戸道徳/金子英雄

権利者：同上

種類：特許

番号：特許願 2018-055331 号

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大内一輝

ローマ字氏名：OHUCHI Kazuki

研究協力者氏名：安藤栞

ローマ字氏名：ANDO Shiori

研究協力者氏名：佐藤ありす

ローマ字氏名：SATO Arisu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。